Untersuchungen über Pyocyaneusbakteriophagen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Kennziffer: D 30

vorgelegt von Waltrude Franz
aus Nieder-Mörlen

1954

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Zusammenfassung

Die Erscheinung einer „übertragbaren Bakterienauflösung“ war erstmals im Jahre 1915 von TWORT beschrieben worden, ohne daß jedoch ihre Identität mit der Bakteriophagie erwiesen war.

Dem Bakteriologen D'HERELLE gelang es im Jahre 1917 ein besonderes lytisches Prinzip als Ursache dieser Bakterienauflösung festzustellen. Auf Grund seiner experimentellen Beobachtungen kam D'HERELLE zu dem Schluß, daß die Aufhellung von trüb bewachsenen Bakterienkulturen durch eine ultravisible Substanz herbeigeführt werden mußte, die viel kleiner war als ein Bakterium, und daß sich dieses Agens auf Kosten der Bakterien vermehrte. Dieses Lysin nannte D'HERELLE „Bakteriophage“.

Mit Pyocyaneusbakteriophagen beschäftigte sich erstmals OKUDA im Jahre 1923. Seine Untersuchungen zeigten, daß bei der Lysis der Pyocyaneuskulturen zwei verschiedene Erscheinungen auftreten. Einmal Flecke mit Silberglanz und zum anderen sterile Flecke ohne Silberglanz.

Neben den freien lytischen Phagen, die alle Bakterien einer Gruppe aufzulösen vermögen, gibt es auch solche, die sich als Symbionten in dem Zellinneren eines Wirtsbakteriums aufhalten. Beide, das Bakterium und der dazugehörige Phage, sind miteinader vergesellschaftet, ohne daß der Bakteriophage sein homologes Bakterium zerstört.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß man auch bei den Pyocyaneusbakteriophagen zwischen lytischen und symbiontischen unterscheiden kann.

Mit Hilfe von verschiedenen Methoden war eine nähere Charakterisierung von sieben selbstgezüchteten symbiontischen (Phagenstamm Nr. 2, 3, 4, 15, 18, 22 und 24) und einem lytischen Pyocyaneusbakteriophagen („Paris“), der aus dem Institut Pasteur in Paris stammte, möglich.

Die Gewinnung der sieben symbiontischen Phagen erfolgte in nachstehend beschriebener Weise: Abgeschwemmte Pyocyaneusschrägagarkulturen wurden bei 4 200 — 5 000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Die klare Flüssigkeit, die sich über dem Bodensatz in dem Zentrifugenglas befindet, wird 40 Minuten in einem Wasserbad bei 58° C erhitzt, um so eine bakterienfreie Phagenlösung zu erhalten. (WARNER 1950).

Für die Isolierung von Bakteriophagen ist es weiterhin wichtig, einen sensiblen Indikatorstamm, d. h. einen solchen, der für die Phageneinwirkung sehr empfindlich ist, zu finden.

Mit Hilfe solcher sensibler Pyocyaneusbakterienstämme war es möglich, die sieben symbiontischen Pyocyaneusbakteriophagenstämme mittels Flecktest zu isolieren.

Zur Titerbestimmung der Phagenlösungen kam die APPELMANS'sche Methode mit einer kleinen Abänderung zur Anwendung. Nach dieser Methode wurden sowohl der lytische Phage „Paris" als auch die sieben symbiontischen Phagen mit ihrem jeweils optimalen Indikatorstamm austitriert.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der Titer der symbiontischen Phagen sehr niedrig ist. Die Wirksamkeit der so gewonnenen Pyocyaneusbakteriophagen kann man durch geeignete Passagen erhöhen. Der Titer des lytischen Phagen (Paris) steigt bei einer Anreicherung rascher an und erreicht außerdem ein höheres Niveau als der der sieben symbiontischen Phagen.

Zur Charakterisierung und Beschreibung des lytischen und der symbiontischen Pyocyaneusbakteriophagen diente ferner die Methode der Auszählung von Lochkolonien mit Hilfe der Agarschichtmethode. Der Titer der symbiontischen Phagen ist, wie zu erwarten war, auch bei der Agarschichtmethode bedeutend niedriger als der des lytischen Phagen.

Ein weiteres Merkmal, das die symbiontischen Phagen von dem lytischen Phagen Paris unterscheidet, ist die Lochgröße. Der lytische Phage bildet größere Löcher als die symbiontischen Phagen.

Durch Neutralisationsversuche ist die Möglichkeit gegeben, einen Einblick in die serologischen Verwandtschaftsverhältnisse der hier untersuchten Pyocyaneusbakteriophagen zu gewinnen. Der lytische Phage Paris und die symbiontischen Pyocyaneusbakteriophagen 2, 3, 18, 22 und 24 sind serologisch mehr oder weniger verwandt. Die Phagen 4, 15 und 3 jedoch weisen mit dem lytischen Phagen Paris keine serologische Verwandtschaft auf. Alle symbiontischen Phagen sind miteinander mehr oder weniger serologisch verwandt.

Durch Hitzeresistenzversuche wurde gezeigt, daß die symbiontischen Phagen viel hitzeresistenter sind als der lytische Phage.

Weiterhin wurden Untersuchungen angestellt, inwieweit eine Typenumformung bei Pyocyaneusbakterien mit Hilfe der symbiontischen Phagen durchzuführen ist und ob hierbei eine Verschiedenheit in der Wirkungsweise der einzelnen symbiontischen Phagen zu erkennen ist. Diese Resistenzversuche ergaben, daß Pyocyaneusbakterienstämme durch Behandlung mit einem symbiontischen Phagen resistent werden; es war jedoch festzustellen, daß die resistenten Bakterien noch gegen andere symbiontischen Phagen sehr sensibel sind.

Die Vermehrungszeit des lytichen Phagen Paris, die sich unterteilt in die Adsorptionszeit des Phagen an das Bakterium, die Invasionszeit und die Zerstörung des Bakteriums, wodurch neue Phagen frei werden, beträgt 35 Minuten.

Um etwas über die Größe der Pyocyaneusbakteriophagen zu erfahren, wurde die Methode der Ultrafiltration herangezogen. Die Ultrafiltration des Phagen Paris ergab, daß die Größe dieses Phagen zwischen 10 und 50 m μ liegt.

Eine elektronenmikroskopische Darstellung gelang nicht.

Lebenslauf

Am 6. März 1928 wurde ich, Waltrude Maria Franz, als Tochter des Lehrers Gottfried Franz und seiner Ehefrau Klara geb. Kaiser in Kaichen, Kreis Friedberg (Hessen), geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule (1934 — 1938) zu Ockstadt, Kreis Friedberg, trat ich an Ostern in die Schillerschule in Friedberg ein.

Ab Ostern 1940 besuchte ich das Realgymnasium zu Bad Nauheim, an dem ich im September 1946, nach Absolvierung eines Sonderlehrganges für Kriegsteilnehmer, mein Abitur ablegte.

Zum Sommersemester 1947 wurde ich in der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main eingeschrieben. Ich belegte die Fächer Botanik (mit besonderer Berücksichtigung der Mikrobiologie), Zoologie, Chemie und Physik. Im Mai 1950 legte ich in Botanik, Zoologie und Chemie die Zwischenprüfung ab.

Von 1950 bis 1952 arbeitete ich an der Abfassung meiner wissenschaftlichen Dissertation. Der experimentelle Teil meiner Arbeit wurde im Hygienischen Institut der Universität zu Frankfurt am Main ausgeführt.

Die Doktorprüfung an der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität wurde am 15. Februar 1954 abgelegt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Schloßberger

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Montfort.

54/178 X